RTS079

RSV Q – PCR Alert Kit

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto **RSV (VSR – Vírus Sincicial Respiratório) Q - PCR Alert AmpliMIX kit** faz parte de um ensaio de amplificação de ácidos nucleicos para detecção do cDNA do RSV A (RSV A) e B do Vírus Sincicial Respiratório (RSV B) no produto da transcrição reversa, reação obtida a partir do RNA extraído de esfregaço nasal, da faringe, da boca, da garganta e das culturas celulares.

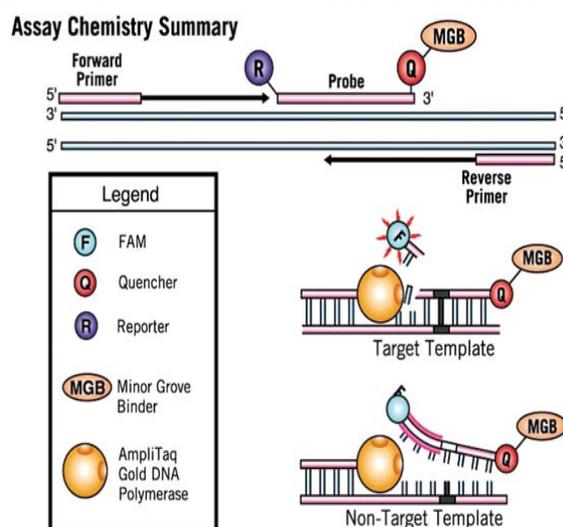
O produto é destinado para ser utilizado juntamente com outros dados clínicos e exames laboratoriais no diagnóstico de infecções pelo vírus RSV.

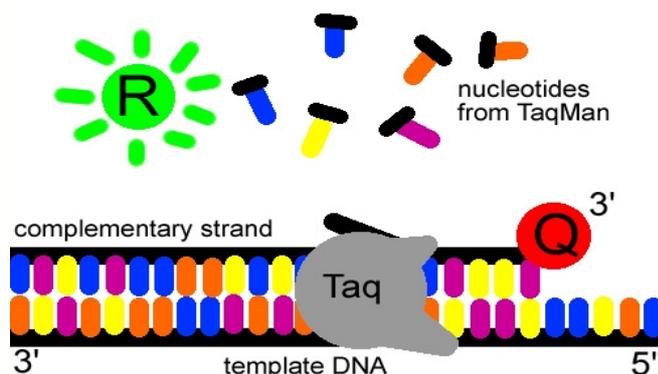
PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

O processo envolve uma reação de amplificação em tempo real em microplacas com um aquecedor ótico programável com sistema de detecção de fluorescência (termociclador em tempo real).

Em cada poço, uma reação de amplificação é realizada para a região específica do gene que codifica a nucleoproteína do RSV e para uma região do genoma RNA do MS2 (teste de adequação interna da amostra) utilizando o cDNA produzido na reação de transcrição reversa das amostras de ensaio.

Uma sonda específica para o RSV rotulado com FAM fluoróforo é ativado quando hibridizado com o produto específico da amplificação do RSV. A sonda específica para o Controle Interno rotulado com o VIC fluoróforo é ativado quando hibridizado com o produto específico da reação de amplificação de Controle Interno.

O processamento dos dados determina a presença do RSV e do cDNA na amostra inicial.

A partir do momento que a sonda TaqMan® for ligada à parte específica do gabarito de DNA, depois da desnaturação (alta temperatura) e resfriamento da reação, os primers se anelam ao DNA. A TaqPolimerase então adiciona nucleotídeos e remove a sonda TaqMan® do DNA gabarito. Isso

separa o quencher do reporter e permite ao reporter emitir sua energia. Isso é, então, quantificado usando um computador. Quanto mais ocorrer a desnaturação e anelamento, mais oportunidades a TaqMan® terá de se ligar e, em contra partida, mais luz emitida será detectada.

O corante do repórter é liberado da dupla fita de DNA criada pela Taq Polimerase. Longe do corante quencher, a luz emitida do corante repórter em estado excitado pode, agora, ser observada.

A padronização do sistema foi realizada nos instrumentos da Applied Biosystems ABI PRISM série 7000.

COMPONENTES FORNECIDOS

O produto fornece a mistura dos primers oligonucleotídeos do AmpliMIX para uma amplificação em tempo real em uma solução estabilizada, pré-aliquotada em dois tubos de ensaio descartáveis.

Cada tubo contém 110 µL de solução, suficiente para 24 testes. Os primers oligonucleotídeos para RSV são específicos para um gene que codifica a região da nucleoproteína do RSV.

Para o teste de adequação da amostra, os primers oligonucleotídeos internos, são específicos para uma região do genoma RNA do bacteriófago MS2. O produto oferece 48 determinações, incluindo os controles.

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
RSV Q-PCR Alert AmpliMIX - RTS079-M	Mistura de primers de oligonucleotídeos	2 x 110 µL	Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
RSV Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTS079-P	Mistura de sondas fluorescentes marcadas com FAM / MGB-NFQ e com VIC / MGB-NFQ	2 x 110 µL	Oligonucleotídeos fluorescentes, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Q-PCR Alert AmpliMASTER - RTS000	Mistura de reagentes optimizados	2 x 340 µL	TRIS (base e cloridrato), Glicerol, $MgCl_2$, Desoriboxinucleotídeos trifosfatos, ROX, Uracil-N-glicosilase, Taq DNA polimerase hot start
	Microplaca com 96 pocinhos de 0,2 mL	2	Plástico PP
	Lâmina adesiva vedante	2	Plástico e cola

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Tampa laminar com ventilação.
- Luvas descartáveis de látex, ou material similar, livres de pó.
- Misturador tipo Vórtex.
- Microcentrífuga de bancada (12000 – 14000 RPM)
- Micropipetas esterilizadas e ponteiras com filtro aerossol ou deslocamento positivo (0,5 – 10 µL, 2 – 20 µL, 5 – 50 µL, 50 – 200 µL, 200 – 1000 µL).
- Água bidestilada esterilizada.
- Sistema de detecção com fluorescência ótica e aquecimento programável.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Componente	Referência modelo	Quantidade	Estocagem
RSV Q-PCR Alert AmpliMIX	RTS079-M	4 x 110 µL	-20°C
RSV Q-PCR Alert AmpliPROBE	RTS079-P	4 x 110 µL	-20°C
Q-PCR Alert AmpliMASTER	RTS000	4 x 340 µL	+ 2° / +8°C
Microplaca para amplificação		3	Temp. Ambiente
Lâmina adesiva para amplificação		3	Temp. Ambiente

PRECAUÇÕES

O kit é exclusivamente para uso *in vitro*.

Cuidados e precauções gerais

Tratar todas as amostras biológicas como se elas fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evitar contato direto com amostras biológicas. Evitar respingar ou pulverizar. Os materiais que vem em contato com amostras biológicas devem ser tratados com Hipocloreto de Sódio 3% por pelo menos 30 minutos ou autoclavados a 121°C por uma hora antes de serem descartados.

Tratar todos os reagente e materiais de análise como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evitar contato direto com os reagentes. Evitar respingar ou pulverizar. Os restos devem ser tratados e descartados de acordo com as medidas de segurança apropriadas. Materiais combustíveis descartáveis devem ser incinerados. Restos de líquidos contendo ácidos ou bases devem ser neutralizados antes do descarte.

Utilizar roupas, luvas e máscara de proteção adequadas.

Nunca pipetar as soluções com a boca.

Não comer, beber, fumar ou utilizar produtos cosméticos na área de trabalho.

Lavar as mãos cuidadosamente após manipular amostras e reagentes.

Descartar os restos de reagentes e excessos de acordo com os regulamentos em vigência.

Ler todas as instruções fornecidas no kit enquanto realiza a análise.

Não utilizar o kit após expirar a data de validade.

Utilizar apenas reagentes fornecidos no kit e aqueles recomendados pelo fabricante.

Não misturar os reagentes de lotes diferentes.

Não utilizar reagentes de kits de outros fabricantes.

Cuidados e precauções para biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como extração, transcrição reversa, amplificação e detecção de ácidos nucleicos, requerem uma equipe qualificada para prevenir o risco de resultados errôneos, especialmente devido à degradação dos ácidos nucleicos contidos nas amostras ou devido à contaminação da amostra por produtos da amplificação.

É necessário haver áreas separadas para a extração / preparação das reações de amplificação e para a amplificação / detecção de produtos da amplificação.

São necessários jalecos, luvas e ferramentas exclusivamente empregadas na extração / preparação de reações de amplificação e para amplificação / detecção de produtos amplificados. Nunca passar com jalecos, luvas ou ferramentas da área designada para amplificação / detecção de produtos amplificados para a área designada para extração / preparação de reações de amplificações.

As amostras devem ser exclusivamente empregadas para esse tipo de análise. As amostras devem ser manuseadas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos de teste contendo diferentes amostras nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para lidar com as amostras devem ser exclusivamente empregadas para esse propósito especifico. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou serem usadas com ponteiras com filtro aerossol. As ponteiras empregadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases, livre de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manuseados em uma câmara de fluxo laminar. Os reagentes requeridos na amplificação devem ser preparados de modo que eles possam ser utilizados em uma sessão única. As pipetas empregadas para lidar com os reagentes devem ser utilizadas exclusivamente para esse propósito. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo ou serem usadas com ponteiras com filtro aerossol. As ponteiras empregadas devem ser esterilizadas, livres de DNases e RNases, livre de DNA e RNA.

Os produtos da amplificação devem ser manuseados de maneira que se reduza a dispersão para o ambiente o máximo possível, a fim de evitar a possível contaminação. As pipetas utilizadas para lidar com os produtos de amplificação devem ser empregadas unicamente para esse propósito especifico.

Cuidados e precauções específicos para componentes

Os tubos de teste contendo **AmpliMIX** para a **primeira** e **segunda amplificação** e para **amplificação controle** são descartáveis e, portanto, devem ser usadas apenas uma vez em reações de mistura.

Os **OligoMIXes** não oferecem risco, mas possuem os seguintes avisos de segurança:

S: 23/25 – Não inalar gás/fumaça/vapor/liquido pulverizado. Evitar contato com os olhos.

CUIDADOS COM A AMOSTRA BIOLÓGICA

Amostras

Esse kit deve ser utilizado com o produto da transcrição reversa (**cDNA**) obtido do RNA extraído das seguintes amostras biológicas: esfregaço nasal, da faringe, da boca, da garganta e, sobretudo, das culturas celulares.

Lavagem nasal e da faringe

As amostras de lavagem nasal e da faringe que são utilizadas para extração do RNA devem ser preparadas de acordo com as especificações do laboratório, ressuspensa em solução fisiológica esterilizada ou PSB esterilizado, contadas e armazenadas a +2°/+8°C por

no máximo quatro horas, caso contrário, deve ser congelada e armazenada a -20°C durante no máximo trinta dias ou a -70°C durante períodos mais longos.

É aconselhável dividir as amostras que serão armazenadas e congeladas pequenas porções de forma a evitar repetidos ciclos de congelamento e descongelamento.

Instruções de pré-tratamento de amostras clínicas e extração de RNA estão contidas no manual de instruções dos kits «EXTRAgen ®».

Amostra da lavagem da garganta

As amostras de lavagem da garganta que são utilizadas para extração do RNA devem ser preparadas de acordo com as especificações do laboratório, diluída em solução fisiológica esterilizada ou PSB esterilizado, contadas e armazenadas a +2°/+8°C por no máximo quatro horas, caso contrário, deve ser congelada e armazenada a -20°C durante no máximo trinta dias ou a -70°C durante períodos mais longos.

É aconselhável dividir as amostras que serão armazenadas e congeladas pequenas porções de forma a evitar repetidos ciclos de congelamento e descongelamento.

Instruções de pré-tratamento de amostras clínicas e extração de RNA estão contidas no manual de instruções dos kits «EXTRAgen ®».

Cultura Celular

As amostras de cultura celular que são utilizadas para extração do RNA devem ser preparadas de acordo com as especificações do laboratório, ressuspensa em solução fisiológica esterilizada ou PSB esterilizado, contadas e armazenadas a +2°/+8°C por no máximo quatro horas, caso contrário, deve ser congelada e armazenada a -20°C durante no máximo trinta dias ou a -70°C durante períodos mais longos.

É aconselhável dividir as amostras que serão armazenadas e congeladas pequenas porções de forma a evitar repetidos ciclos de congelamento e descongelamento.

Instruções de pré-tratamento de amostras clínicas e extração de RNA estão contidas nas instruções de uso do kit «EXTRAgen ®».

Interferência de substâncias

É recomendável validar todos os procedimentos de análise de cada extração e sessão de amplificação processando uma amostra que já foi testada como positiva e negativa ou com um material de calibração de referência.

O cDNA deve ser produzido a partir de RNA que não contém mucoproteínas para evitar o problema de inibição, bem como a possibilidade da frequência de resultados inválidos.

Não existem dados disponíveis quanto à inibição provocada por antibióticos, medicamentos antivirais, medicamentos quimioterápicos e imunossupressores.

Controles de Amplificação

É absolutamente obrigatório para validar cada sessão de amplificação com uma reação de controle negativo e positivo.

Para o controle negativo, utilize água bidestilada esterilizada (não fornecida com o produto) adicionada reação no local do cDNA obtido a partir do RNA extraído. Para o controle positivo use o produto «RSV – Positive Control».

Controle de Qualidade

Recomenda-se, para a validação do processo de análise, que cada sessão de extração e amplificação através da transformação de uma amostra negativa e uma amostra positiva, seja testada ou calibrada com material de referência.

PROCESSO DE MEDIÇÃO

Configurando o Termociclador
(A ser utilizado na área de amplificação/detecção dos produtos amplificados)

Antes de começar a sessão, consultar o manual do sistema e:

- Ligar o termociclador em tempo real, ligar o computador abra o programa e iniciar uma sessão de: "quantificação absoluta".
- Definir o detector para sonda de Controle Interno com o repórter do "VIC" e “quencher” como "nenhum". (NFQ= Não Fluorescente “quencher”) e marcar como “CI”;
- Para cada poço utilizado na microplaca, definir o "detector" como (tipo de fluorescência que será medida), a "referência passiva", como "ROX" (normalização da fluorescência medida) e tipo de reação (amostra, controle de amplificação negativa ou controle de amplificação positiva).
- Adicionar esta informação na planilha que está inclusa no final deste manual de instruções ou imprima o layout da microplaca.

A planilha deve ser seguida atentamente durante a transferência da reação da mistura e durante a reação das amostras nos poços.

Abaixo segue um exemplo de como a análise de 13 amostras pode ser organizada.

Siglas:
S1 – S13: Amostras que serão analisadas;
NC: Controle de Amplificação Negativa
PCA: RSV A Controle de Amplificação Positiva
PCB: RSV B Controle de Amplificação Positiva

- Consultando o manual do equipamento, selecionar 45 ciclos em ciclo-termal e o volume da reação de 25 µL e, quando possível, definir a opção “emulação de 9600".

Ciclo Termal de Amplificação		
Fase	**Temperatura**	**Tempo**
Descontaminação	50°C	2 min.
Desnaturação inicial	95°C	10 min.
45 Ciclos	95°C	15 seg.
	60°C	1 min.

Preparação da amplificação
(A ser utilizado na área de extração/preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar a sessão, é importante que se faça o seguinte:

- Retirar e descongelar os tubos de ensaio que contém as amostras que serão analisadas. Agitar delicadamente os tubos de ensaio e centrifugar durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e manter o gelo.
- Retirar e descongelar os tubos de ensaio, AmpliMIX necessários para a sessão, lembrando que o conteúdo do todos os tubos é suficiente para 24 reações. Agitar delicadamente os tubos de ensaio e centrifugar durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e manter o gelo.
- Retirar e descongelar o mesmo número de tubos do AmpliMIX para o AmpliPROBE. Agitar delicadamente os tubos de ensaio e centrifugar durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e manter o gelo.
- Retirar e descongelar o mesmo número de tubos do AmpliMIX para o AmpliMASTER. Escrever "RSV" e a data no rótulo do tubo de ensaio usando tinta indelével. Agitar delicadamente os tubos de ensaio e centrifugar durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e manter o gelo.
- Retirar e descongelar o RSV A Controle Positivo e RSV B Controle Positivo. Agitar delicadamente os tubos de ensaio e centrifugar durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo e manter o gelo.
- Remover a microplaca de amplificação que será utilizada na sessão, o procedimento deve ser feito utilizando luvas descartáveis de látex, ou material similar, livres de pó, evitando assim, danos aos poços.

1. Transferir 100 µL de AmpliMIX ao tubo do AmpliMASTER. Misture bem e pipete o volume de 100 µL três vezes na mistura.
2. Transferir 100 µL de AmpliPROBE ao tubo do AmpliMASTER. Misture bem e pipete o volume de 100 µL três vezes na mistura.
3. Misture utilizando o Vórtex, com velocidade baixa por 5 segundos, evitando a criação de espuma no produto.
4. Centrifugue os tubos durante 5 segundos para levar o conteúdo para o fundo.
5. Depositar delicadamente 20 µL da mistura da reação obtida nos poços da microplaca de amplificação, conforme estabelecido anteriormente na planilha.

OBSERVAÇÃO: Se nem toda a mistura for utilizada, o restante do volume deve ser armazenado no escuro, a -20°C durante, no máximo, um mês. O tubo de ensaio deve ser rotulado como "RSV". Congelar e descongelar a mistura da reação apenas uma vez.

6. Depositar delicadamente 5 µL do extrato de cDNA, proveniente da primeira amostra, na mistura da reação no poço da microplaca de amplificação, conforme anteriormente estabelecido na worksheet. Prossiga desta maneira para todos os outros extratos cDNA.
7. Depositar delicadamente 5 µL de água estéril bidestilada (não fornecida com o produto) na mistura da reação no poço de controle negativo da microplaca de amplificação, conforme anteriormente estabelecido na planilha.
8. Depositar delicadamente 5 µL de RSV Controle Positivo da reação da mistura e 5 µL de RSV B Controle Positivo no poço correspondente da microplaca conforme estabelecido anteriormente na planilha.

9. Sele cuidadosamente a microplaca de amplificação utilizando a folha de adesivos para amplificação.
10. Transfira a microplaca de amplificação para o termociclador em tempo real na área de amplificação/detecção de produtos e inicie o ciclo de amplificação termal.

CALIBRAÇÃO DO PROCESSO

Para este tipo de ensaio e metodologia não existe procedimento de calibração para o processo de medição.

CÁLCULOS E OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

Análise qualitativa dos resultados

Os valores de fluorescência emitida pela sonda específica para o RSV (FAM "RSV" detector) e pela sonda específica para o Controle Interno ("CI" VIC fluorescência) na reação de amplificação devem ser analisados pelo software específico.

Antes de analisar, consultar a documentação do instrumento:

- Consultando o manual do equipamento, programar manualmente o "baseline" (nível de fundo fluorescente) do ciclo 6 ao ciclo 15*;

OBSERVAÇÃO: No caso de uma amostra positiva, com um alto título de RSV, a fluorescência FAM da sonda específica para RSV pode começar a crescer antes do 15º ciclo. Neste caso o intervalo de cálculo da "baseline" deve ser adaptado do ciclo 6 ao ciclo em que a fluorescência FAM começar a aumentar.

- programar manualmente o Limiar (Thereshold) para a fluorescência FAM "RSV" a 0,2;
- programar manualmente o Limiar (Thereshold) para a fluorescência VIC "CI" a 0,1.

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas para RSV na reação de amplificação e o valor Threshold permitem determinar o Ct (ciclo Threshold), o ciclo em que a fluorescência atinge o valor Threshold.

Na reação de amplificação do Controle Positivo o valor de cT para a sonda específica RSV é usado para validar a amplificação e a detecção como descrito na tabela seguinte:

Reação do Controle Positivo RSV (FAM)	Resultado	Amplificação/Detecção
cT ≤ 25	Positivo	Correto

Se o resultado da reação de amplificação do controle positivo for cT > 25 ou cT indeterminado, isso significa que o alvo do DNA não foi detectado. O problema ocorreu durante a amplificação ou na fase de detecção (preparação incorreta da mistura da reação, dispensa incorreta da reação da mistura ou do controle positivo, degradação da sonda ou do controle positivo, posição incorreta do controle positivo, programação incorreto da termociclagem), que podem ter levado a resultados falsos negativos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Na reação de amplificação do controle negativo, o valor do Ct da sonda específica para RSV é utilizado para validar amplificação e a detecção, como mostrado na tabela a seguir:

Reação do Controle Negativo RSV (FAM)	Resultado	Amplificação/Detecção
cT indeterminado	Negativo	Correto

Se o resultado da reação de amplificação do Controle negativo é diferente de Indeterminado, a presença do DNA alvo foi detectada. Isso significa que problemas ocorreram na fase de amplificação (contaminação) que podem ter levado a resultados incorretos e falsos positivos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

O valor do cT da sonda específica para o RSV na reação de amplificação de cada amostra é utilizado para detectar a presença do alvo DNA, enquanto que os valores de Ct das sondas específicas para o Controle Interno são utilizados para validar a extração, transcrição reversa, amplificação e detecção.

Verificar no software do instrumento que o cT foi determinado por um rápido e regular crescimento dos valores de fluorescência e não por picos ou incremento de sinal fundo.

Este produto é capaz de detectar uma quantidade mínima de aprox. 10 cópias de cDNA do gene que codifica a Nucleoproteína do RSV por reação de amplificação, correspondente ao genoma Equivalente por reação (veja Características de Desempenho).

Os resultados do Ct para cada amostra são interpretados conforme mostrado na tabela:

Reação da Amostra		Adequação da Amostra	Resultado da Análise	RSV cDNA
RSV (FAM)	Controle Interno (VIC)			
cT Indeterminado	cT > 35 ou Ct indeterminado	Não Adequada	Inválida	-
	cT ≤ 35	Adequada	Válida, Negativa	NÃO DETECTADO
Ct Determinado	cT > 35 ou Ct indeterminado	Adequada*	Válida, Positiva	PRESENTE
	cT ≤ 35	Adequada	Válida, Positiva	PRESENTE

Se o resultado da reação de amplificação da amostra **é cT indeterminado para RSV cDNA e cT > 35 ou indeterminado para o controle interno**, isto significa que o cDNA do Controle Interno não foi detectado de forma eficiente. Neste caso, problemas ocorreram durante a fase de amplificação (amplificação inválida ou ineficiente) ou na fase de transcrição reversa (transcrição reversa ineficiente ou inválida) ou na fase de extração (ausência de DNA ou presença de inibidores) os quais podem ter causado resultados falsos negativos. A amostra não é adequada, o ensaio é inválido e precisa ser repetido começando pela extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é **cT indeterminado para RSV cDNA e cT ≤ 35 para o Controle Interno**, isto significa que o cDNA RSV não foi detectado no cDNA obtido a partir da amostra, **mas não é possível excluir a presença de cDNA em título menor que o limite de detecção do produto (verificar parágrafo que trata de Características de Desempenho). Neste caso o resultado seria um falso negativo.**

Os resultados obtidos com este ensaio devem ser interpretados levando em consideração todos os dados clínicos e os outros testes laboratoriais efetuados no paciente.

OBS.: quando cDNA RSV é detectado na reação de amplificação da amostra a amplificação do Controle Interno pode resultar em Ct > 35 ou indeterminado. De fato, a baixa eficiência da reação de amplificação do Controle Interno pode ser ocasionada pela alta eficiência da reação de amplificação do cDNA RSV. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do teste é válido.

Cálculo do Limite de Detecção

$$\text{Limite de detecção (gEq / ml)} = \frac{\text{Ve x Vp x 10 gEq}}{\text{Vc x Vt x Va x Ee x Et}}$$

- **Vc**: é o volume da amostra utilizada na extração; por exemplo, com EXTRAgen o parâmetro do Vc é de 0,3 mL.
- **Ee**: é a eficiência da extração; por exemplo, com EXTRAgen o parâmetro Ee é 0,8 (eficiência mínima de 80%).
- **Ve:** é o volume total da extração do produto; por exemplo, com EXTRAgen o parâmetro do Ve é de 15 µL.
- **Vt:** é o volume da extração do produto utilizado na transcrição reversa da reação; por exemplo, com o RT – Kit Plus o parâmetro é 10 µL.
- **Et:** é a eficiência da reação de transcrição reversa; por exemplo, com o RT – Kit Plus o parâmetro é 0,5 (eficiência de 50%).
- **Vp:** é o volume total da reação de transcrição reversa; por exemplo, com o RT – Kit Plus o parâmetro é 25 µL.
- **Va:** é o volume do produto de reação de transcrição reversa utilizado na reação de amplificação: o parâmetro Va para este produto é de 5 µL.

Quando o kit de extração EXTRAgen e o RT – Kit Plus são utilizados, o limite de detecção é:

Produto	Limite de detecção
EXTRAgen® RT – Kit plus	625 gEq / mL

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Com esse produto, utilizar apenas cDNA obtido por transcrição reversa de RNA extraído das seguintes amostras humanas: sangue periférico coletado em EDTA, sangue medular coletado em EDTA ou Citrato de Sódio, suspensões de leucócitos, suspensões de linfomonócitos.

Com esse produto, não utilizar cDNA obtido por transcrição reversa de RNA extraído de amostra de heparina: a heparina inibe a reação de transcrição reversa e a reação de amplificação de ácidos nucleicos e causa resultados inválidos.

Não utilizar cDNA obtido por transcrição reversa de RNA contaminados por hemoglobina ou Ficoll™: essas substâncias podem inibir a reação de transcrição reversa e a amplificação do ácido nucleico e causar resultados inválidos.

Não há dados disponíveis sobre a inibição causada por antibióticos, drogas antivirais, drogas quimioterapêuticas ou imunossupressores.

Os resultados obtidos com esse produto estão sujeitos à coleta, transporte, armazenamento e preparação correta das amostras. Para evitar erros nos resultados é

necessário tomar alguns cuidados particulares durante essas fases e seguir cuidadosamente as instruções fornecidas com os produtos para extração do ácido nucleico.

Devido a sua alta sensibilidade analítica, a análise de amplificação “nested” de ácidos nucleicos usada nesse produto é sujeita a contaminação por amostras clínicas positivas para RSV, controles positivos e os próprios produtos da reação de amplificação. A contaminação leva a falsos resultados positivos. O produto foi desenvolvido de forma a reduzir a contaminação; todavia esse fenômeno só pode ser prevenido seguindo práticas de laboratório corretas e cumprindo de forma meticulosa as instruções fornecidas no manual.

Esse produto deve ser manuseado por uma pessoa com experiência em processamento de amostras biológicas com potencial infeccioso e preparações químicas classificadas como perigosas para prevenir acidentes com consequências potencialmente sérias para o usuário e outras pessoas.

Esse produto requer o uso de roupas de trabalho e premissas que são adequadas para o processamento de amostras de potencial infeccioso e preparações químicas classificadas como perigosas para prevenir acidentes com consequências potencialmente sérias para o usuário e outras pessoas.

Esse produto deve ser manuseado por uma pessoa competente em técnicas de biologia molecular, como extração, amplificação e detecção de ácidos nucleicos, para evitar erros nos resultados.

É necessário haver áreas separadas para extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção de produtos da amplificação para prevenir falsos resultados positivos.

Esse produto requer o uso de roupas especiais e instrumentos para extração/preparação de reações de amplificação diferentes dos usados para amplificação/detecção de produtos da amplificação para evitar falsos resultados positivos.

Um resultado negativo obtido com esse produto sugere que os cDNA RSV não foi detectado no produto da transcrição reversa obtido do RNA extraído da amostra, mas isso não quer dizer que o cDNA RSV não está presente em titulações menores que o limite de detecção para o produto (limite de detecção para o produto, ver parágrafo na Características de Desempenho deste manual); nessa caso o resultado pode ser um falso negativo.

Como qualquer teste diagnóstico, há um risco residual de se obter resultados inválidos, falsos positivos e falsos negativos, com esse produto. Esse risco residual não pode ser eliminado ou reduzido de qualquer maneira. Em situações particulares como em diagnósticos emergenciais, esse risco residual pode contribuir para decisões incorretas com consequências potencialmente graves para o paciente.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Controle de Qualidade

É aconselhável confirmar o completo procedimento de análise de cada sessão, extração e amplificação, utilizando uma amostra negativa e uma amostra positiva.

Como amostra negativa, utilizar uma amostra negativa já testada ou ainda da água bidestilada estéril.

Como amostra positiva, utilizar uma amostra positiva para o DNA de RSV já testada.

Controle de Amplificação

É absolutamente necessário confirmar cada sessão de amplificação preparando uma reação de controle negativo e uma reação de controle positivo.

Para o controle negativo, utilizar água bidestilada estéril (não incluída no kit) para

acrescentar à reação no lugar do DNA extraído da amostra.

Para o controle positivo, utilizar o DNA obtido de uma amostra positiva já testada ou o produto CONTROLE POSITIVO Q-RSV.

VALORES DE REFERÊNCIA OBTIDOS EM POPULAÇÕES SADIAS OU VALORES DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ESTATÍSTICOS, DESEJÁVEIS, TERAPÊUTICOS OU TÓXICOS

Não existe este tipo de dado para a metodologia em questão.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade Analítica: limite de detecção

A sensibilidade analítica permite a identificação de aproximadamente 10 moléculas de cDNA em 5 µL de produto obtido pela reação da transcrição reversa do RNA extraído da amostra, adicionada à reação de amplificação.

Em termos de limite de detecção, a sensibilidade analítica do ensaio foi determinada utilizando DNA de plasmídeo contendo o resultado da amplificação do vírus RSV A, RSV B e MS2, cuja concentração inicial foi determinada por espectrofotômetro.

O DNA de plasmídeo que contém o resultado da amplificação do vírus RSV A ou do vírus RSV B foi diluído para uma titulação de 10 cópias / 5 µL em conjunto com o DNA de plasmídeo que contém o produto da amplificação do vírus MS2 diluído para uma titulação de 50.000 cópias / 5 µL. Esta amostra foi utilizada em 50 repetições para amplificação com o produto Nanogen.

O resultado final está resumido na tabela abaixo:

Amostras	No.	Positivo	Negativo
10 cópias de RSV A plasmídeo DNA + 50,000 cópias de MS2 plasmídeo de DNA	50	50	0
10 cópias de RSV B plasmídeo DNA + 50,000 cópias de MS2 plasmídeo de DNA	50	50	0

Sensibilidade diagnóstica: eficiência da detecção de diferentes genótipos

A sensibilidade diagnóstica do ensaio, que é a eficiência de detecção em diferentes genótipos, foi avaliada pela comparação das sequências das bases de dados nucleotídicas.

Analisando as regiões escolhidas pela hibridização dos primers oligonucleotídeos do RSV AmpliMIX e da sonda fluorescente do RSV AmpliPROBE em alinhamento com as sequências disponíveis no banco de dados da região do gene que codifica a Nucleoproteína do RSV, genótipos RSVA e RSVB, mostraram preservação e ausência de mutações significativas.

A sensibilidade diagnóstica da amostra que é a eficiência na detecção em diferentes subtipos foi testada usando amostras positivas de RNA do RSVA e RSVB.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando como material de referência 08 amostras de *swabs* faríngeos que foram considerados positivos para RSV A RNA e 04 amostras de *swabs* faríngeos que foram considerados positivos para RSV B RNA testados usando a amplificação da amostra. Cada amostra usada para realizar o procedimento de análise extração, transcrição reversa e amplificação, utilizou os produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

O resultado final está resumido na tabela abaixo:

Amostras	No.	Positivo	Negativo
Swabs Faríngeos positivos para RSVA	8	8	0
Swabs Faríngeos positivos para RSVB	4	4	0

Sensibilidade diagnóstica: amostras positivas

A sensibilidade diagnóstica para esse teste, de acordo com as amostras clínicas positivas, foi avaliada pela análise de algumas amostras clínicas que foram positivas para RSV DNA e maiores que 95.0%.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada usando como material de referência 20 amostras de *swabs* faríngeos positivas para RSV RNA, elas foram testadas utilizando amplificação em tempo real. Cada amostra usada para realizar o procedimento de análise extração, transcrição reversa e amplificação, utilizou os produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

O resultado final esta resumido na tabela a seguir:

Amostras	No.	Positivo	Negativo
Swabs Faríngeos positivos para RSV	20	20	0

Sensibilidade diagnóstica: amostras negativas

O diagnóstico da especificidade do teste, de acordo com as amostras clínicas negativas, foi avaliado pela análise de algumas amostras clínicas que foram negativas para o RSV RNA e o resultado foi superior a 95,0%.

A especificidade do diagnóstico foi avaliada usando como material de referência 23 amostras de *swabs* faríngeos que eram negativas para RSV RNA e foram testadas utilizando amplificação em tempo real. Cada amostra usada para realizar o procedimento de análise extração, transcrição reversa e amplificação, utilizou os produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

O resultado final esta resumido na tabela a seguir:

Amostras	No.	Positivo	Negativo
Swabs Faríngeos negativos para RSV	23	20	0

Três amostras foram inválidas e foram inibidas mesmo após a extração de uma segunda alíquota e mesmo após outros ensaios de amplificação de ácidos nucleicos.

Especificidade Analítica: Potencial interferência de marcadores

A análise da especificidade do teste, que é a reatividade cruzada com outras potenciais interferências de marcadores, foi avaliada pela comparação das bases de dados das sequências nucleotídicas.

O teste de alinhamento das sequências do oligonucleotídeos RSV AmpliMIX e da sonda fluorescente RSV AmpliPROBE com as sequências disponíveis no banco de dados dos organismos diferentes do RSV, incluindo o Metapneumovírus, este vírus que é semelhante ao RSV, mostrou a sua especificidade e ausência de homologia significativa.

A especificidade analítica das amostras que é a reatividade cruzada com outro marcador de interferência potencial foi avaliada usando amostras clínicas positivas para o ácido nucleico de outros patógenos.

A especificidade analítica foi determinada usando como material de referência 30 amostras de *swabs* faríngeos que eram negativas para RNA do RSV, mas positivas para o ácido nucleico de outros patógenos incluindo:

- 13 para o vírus Influenza A;
- 11 para o vírus Influenza B;
- 01 para o vírus Parainfluenza 1;
- 01 para o vírus Parainfluenza 2;
- 02 para o vírus Parainfluenza 3;
- 01 para o vírus Partitas;
- 01 para o Adenovírus.

Cada amostra usada para realizar o procedimento de análise extração, transcrição reversa e amplificação, utilizou os produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

O resultado final esta resumido na tabela a seguir:

Amostras	No.	Positivo	Negativo
Swabs Faríngeos negativos para RSV e positivos para outros patógenos	30	0	29

Uma amostra foi inválida e também foi inibida com outros testes de amplificação de ácidos nucleicos.

Observações:

Os dados completos e os resultados dos testes efetuados para avaliar as características de desempenho do produto estão registrados na seção 7 do arquivo técnico do produto "RSV Q - PCR alert AmpliMIX" e "RSV Q - PCR alert AmpliPROBE", FTP RTS079.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

STOCKTON J. et al. (1998) *J. Clin. Microbiol*. 36: 2990 – 2995.

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

80298490084

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:

29/01/2014

X

Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

CTR079

RSV - Controle Positivo

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «**RSV - Controle Positivo** » é destinado ao uso como um controle positivo em ensaios qualitativos de amplificação de ácidos nucleicos para a detecção do **cDNA do Vírus Respiratório Sincicial A (RSV A)** e do **cDNA do Vírus Respiratório Sincicial B (RSV B)** com os produtos «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**», « **RSV Q - PCR Alert AmpliMIX**» e « **RSV Q - PCR Alert AmpliPROBE**» da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O kit fornece os componentes:

RSV A - Controle Positivo

Uma solução estabilizada de plasmídeos contendo a sequência requerida, divididas em dois tubos de alíquotas prontas para uso. Cada tubo de teste contém 65 µL de solução, suficiente para 12 sessões.

Os plasmídeos contêm uma região amplificada do gene que codifica Nucleoproteína RSV A. A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação confirma a habilidade de identificar a presença do cDNA do **RSV A**.

RSV B - Controle Positivo

Uma solução estabilizada de plasmídeos contendo a sequência requerida, divididas em dois tubos de alíquotas prontas para uso. Cada tubo de teste contém 65µL de solução, suficiente para 12 sessões.

Os plasmídeos contêm uma região amplificada do gene que codifica Nucleoproteína RSV B. A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação confirma a habilidade de identificar a presença do cDNA do **RSV B**.

O kit possibilita a execução de 12 reações para RSV A e 12 reações para RSV B, usando 5 µL por reação.

MATERIAIS FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
RSV A Controle Positivo	Solução de plasmídeo	**1 x 65 µL**	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura
RSV B Controle Positivo	Solução de plasmídeo	**1 x 65 µL**	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura

- Armazenar a -20°C ou inferior.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Fluxo laminar.
- Luvas descartáveis sem talco.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 – 14.000 RPM).
- Micropipetas estéreis e ponteiras com filtro ou deslocamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Água bidestilada estéril.
- Real Time ABI PRISM 7000, completo com computador.

ACESSÓRIOS

Os reagentes para a extração de RNA das amostras a serem analisadas e os reagentes otimizados para amplificação e detecção do DNA não estão inclusos neste produto. Para realizar estes passos analíticos, os produtos a seguir são recomendados:

- «**EXTRAgen**» (EXTG01), kit para extração de ácidos nucleicos de amostras não celulares; total de 50 extrações.
- «**CPE-RNA – Controle Interno**» (CTRRNA/2), controle positivo de extração para RNA genômico de amostras não celulares, total de 50 extrações.
- «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**» (RTS000/2), combinação de reagentes otimizados, microplacas e adesivos para PCR em tempo real e determinação alélica; total de 48 reações.
- « **RSV Q - PCR Alert AmpliMIX**» (RTS079-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 48 reações.
- « **RSV Q - PCR Alert AmpliPROBE**» (RTS079-P), sondas fluorescentes para PCR em tempo real; total de 48 reações.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Este produto é exclusivamente para uso *in vitro*.

Advertências e precauções gerais

Manusear e descartar todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas. Evitar o contato direto com amostras biológicas. Evitar respingos. Os materiais que entram em contato com amostras biológicas devem ser tratados com hipoclorito de sódio 3% por, no mínimo, 30 minutos, ou autoclavados a 121°C por uma hora antes de serem descartados.

Manusear e descartar todos os reagentes e materiais como potencialmente infecciosos. Evitar contato direto com reagentes. Evitar respingos. Os resíduos devem ser tratados e descartados de acordo com normas de segurança. Resíduos líquidos contendo ácidos ou bases devem ser neutralizados antes do descarte.

Usar jaleco, luvas e óculos de proteção.

Nunca pipetar soluções com a boca.

Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho.

Lavar as mãos cuidadosamente após manusear amostras e reagentes.

Descartar as sobras de reagentes e resíduos de acordo com as normas de segurança.

Ler as instruções de uso antes de utilizar o produto. Seguir as instruções.
Não usar produtos após o prazo de validade estabelecido.
Somente usar os reagentes fornecidos no kit e aqueles recomendados pelo fabricante.
Não misturar reagentes de diferentes lotes.
Não utilizar reagentes de outros fabricantes.

Advertências e precauções de biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal especializado para prevenir o risco de resultados incorretos, em particular devido à degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou devido à contaminação das amostras por produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular. Nunca transferir materiais da área de amplificação/detecção para a área de extração/preparação de reações.

As amostras devem ser empregadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo, ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente a este propósito. As pipetas devem ser do tipo de deslocamento positivo, ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

Advertências e precauções para componentes específicos

Os tubos contendo **Controle Positivo** podem ser congelados e descongelados por no máximo 12 vezes. Um número maior de ciclos de congelamento e descongelamento pode causar uma redução do título.

O **Controle Positivo** apresenta as seguintes advertências (S):

S 23-25 Não inalar vapores. Evitar contato com os olhos.

PROCEDIMENTO

O produto « **RSV - Controle Positivo** » deve ser usado com a mistura de reação obtida com os produtos «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**», « **RSV Q - PCR Alert AmpliMIX**» e « **RSV Q - PCR Alert AmpliPROBE**».

O **Controle Positivo RSV A e o Controle Positivo RSV B** estão prontos para o uso, portanto devem ser usados adicionando 5µL diretamente na mistura de reação.

O procedimento completo envolve preparação e execução de reação de amplificação com termociclador com sistema óptico de detecção de fluorescência. É descrito em detalhes nas instruções de uso do produto « **RSV Q - PCR Alert AmpliMIX**», bem como informações sobre as características de desempenho e limitações do procedimento.

NOTA: Os **Controles Positivos** podem ser congelados e descongelados por no máximo 12 vezes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

STOCKTON J. et al. (1998) *J. Clin. Microbiol.* 36: 2990 – 2995.

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

80298490089

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:
29/01/2014

X

Maurício Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon